

杨妍梅, 李 玉, 覃 圣, 等. 静宁鸡 *PPAR α* 基因克隆与生物信息学分析[J]. 江苏农业学报, 2019, 35(2): 370-377.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2019.02.018

静宁鸡 *PPAR α* 基因克隆与生物信息学分析

杨妍梅, 李 玉, 覃 圣, 蒋刘芽, 赵金潭, 陆晓东, 熊 杰, 陈伟基, 扎西英派
(西北民族大学生命科学与工程学院, 甘肃 兰州 730030)

摘要: 为阐明静宁鸡 *PPAR α* 基因的结构及功能, 根据 NCBI 上登录的原鸡 *PPAR α* 基因的 CDS 序列设计引物, 以静宁鸡肾脏为材料采用 PCR 的方法, 对目的基因进行克隆, 并测序。根据测序的结果, 采用各类分析软件, 对所获得的 DNA 片段进行生物信息学分析。结果成功克隆了静宁鸡 *PPAR α* 基因的全长 CDS 序列。生物信息学分析结果表明, 该基因 CDS 全长 1 407 bp, 所编码的蛋白质包含 468 个氨基酸。其分子量为 52 300, 等电点为 5.85。在二级和三级结构上, α -螺旋和无规则卷曲为蛋白的主要结构形式。*PPAR α* 蛋白是一个亲水性蛋白质, 不存在跨膜区域, 不含信号肽, 没有 *N*-糖基化位点, 但存在 16 个 *O*-糖基化位点, 存在 25 个丝氨酸 (Ser) 磷酸化位点、12 个苏氨酸 (Thr) 磷酸化位点和 6 个酪氨酸 (Tyr) 磷酸化位点。静宁鸡 *PPAR α* 蛋白在第 100~168 个氨基酸之间有 1 个 ZnF_C4 结构域, 在第 264~449 个氨基酸之间有 1 个 HOLI 结构域。同源性分析结果表明, 静宁鸡 *PPAR α* 基因与原鸡的亲缘关系最近。静宁鸡 *PPAR α* 基因的成功克隆和功能预测为进一步研究 *PPAR α* 基因在静宁鸡脂肪代谢中的作用提供了基础。

关键词: 静宁鸡; 过氧化物酶体增殖剂激活受体; 生物信息学分析

中图分类号: Q785 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2019)02-0370-08

Cloning and bioinformatic analysis of *PPAR α* gene in Jingning chicken

YANG Yan-mei, LI Yu, QIN Sheng, JIANG Liu-ya, ZHAO Jin-tan, LU Xiao-dong, XIONG Jie, CHEN wei-ji, ZHA Xi-ying-pai

(College of Life Science and Engineering, Northwest University for Nationalities, Lanzhou 730030, China)

Abstract: In order to clarify the structure and reveal the role of *PPAR α* in Jingning chicken, the CDS sequence of *Gallus gallus PPAR α* was applied, and specific primers were designed accordingly. For the cloning of *PPAR α* , total RNA was extracted from the kidney of Jingning chicken, and PCR was performed. According to the results of sequencing, the obtained DNA fragments were analyzed by various analysis software. Finally, full length CDS sequence of *PPAR α* was successfully obtained. Bioinformatics analysis showed that the CDS of *PPAR α* was 1 407 bp in length, and the encoded protein contained 468 amino acids. Its molecular weight was 52 300, and the isoelectric point was 5.85. In the secondary structure and tertiary structure, the alpha helix and random coil were the main structural forms of the protein. *PPAR α* was a hydrophilic protein, containing sixteen *O*-glycosylation sites, twenty-five Ser phosphorylation sites, twelve Thr phosphorylation sites and six Tyr phosphorylation sites. *PPAR α* did not contain transmembrane structure, signal peptides and *N*-glycosylation sites.

The *PPAR α* protein had a ZnF_C4 domain between the 100th and the 168th amino acid, and a HOLI domain between the 264th and the 449th amino acid. The results of homology analysis showed that *PPAR α* gene of Jingning chicken was closely related to *Gallus gallus*. The successful cloning and functional prediction of *PPAR α* gene in Jingning chicken provide a basis for further study on the role of this gene in the lipid metabolism of Jingning chicken.

收稿日期: 2018-07-08

基金项目: 西北民族大学中央高校基本科研业务费专项 (31920170027、31920170030)

作者简介: 杨妍梅 (1988-), 女, 安徽宿州人, 硕士, 实验师, 主要从事病原生物学与动物疫病防治研究。(E-mail) yangyanmeixinyan@163.com

通讯作者: 扎西英派, (E-mail) zhaxiyingpai@163.com

Key words: Jingning chicken; peroxisome proliferators-activated receptor; bioinformatic analysis

过氧化物酶体增殖剂激活受体(Peroxisome proliferators-activated receptors, PPARs)在1990年被英国科学家 Isseman 和 Green 首先发现^[1]。它是一种新型的固醇类激素受体和配体依赖的核转录因子,属于核受体第一亚家族 C 群(NR1C)^[2]。PPARs 是一个由3种核受体组成的家族,目前已知有3种亚型:PPAR α 、PPAR γ 、PPAR β 。这3种亚型由不同的基因编码,在组织中的表达和功能也不同^[3-4]。PPARs 基因在心脏、脂肪组织、脑、肠、肌肉、脾脏、肺脏、肾上腺和大鼠脊髓中普遍存在。PPARs 基因可被长链脂肪酸激活,广泛存在于体内脂肪代谢旺盛的组织中。

近年来,国内外学者对畜禽 PPARs 进行了深入研究,如 Sundvold 等^[5]对猪10种组织 PPARs 的 Northern blot 检测发现,PPAR α 较高表达于肝脏和肾脏,中等程度表达于心肌、骨骼肌和小肠。Diot 等^[6]对鸡9种组织进行 Northern blot 检测,结果显示鸡 PPAR α mRNA 在肝脏、心脏和肾脏中高表达,在尾脂腺也有较高的表达。孟和等^[7]的研究结果表明,PPAR α mRNA 只在鸡心脏、肝脏、肾脏和胃这4种组织中表达,在肝脏杂交信号最强。田亚东等^[8]的研究结果表明,PPAR α 基因影响鸡体脂肪代谢。孟和等^[9]的研究结果表明,PPAR α 基因已在AA肉鸡中检测到单碱基突变位点,在3种中国地方品种中也检测到,如石岐杂鸡、北京油鸡和白耳鸡。该突变位点显著影响鸡群的腹脂质量和胴体性状,推测该基因是影响鸡体脂肪代谢的主效基因或与控制该性状的主效基因连锁,因此,它可作为鸡脂肪性状的标记辅助选择的分子标记^[9],该研究结果与田亚东等^[8]所得结果相似。

静宁鸡主产区分布在甘肃省静宁县和宁夏回族自治区固原市,甘肃省庄浪、通渭、华亭、秦安和会宁,宁夏回族自治区隆德、泾源和西吉等也有分布,静宁鸡以静宁县的鸡源多和品质好而得名。静宁鸡以低脂肪、高蛋白、肉质鲜嫩、鸡汁鲜美而闻名^[10]。由于在实际生产中,静宁鸡生长速度较缓,在一定程度上影响了该品种的开发利用,以致静宁鸡日趋减少且表现出混杂退化的趋势。随着人们消费水平的提高,对低脂肪高蛋白质肉质的需求也逐渐提升。目前,PPAR α 的研究主要集中在啮齿动物和人体上,并且在家禽中也有 PPAR α 的报道,但是没有关

于静宁鸡 PPAR α 的报道。因此,本研究以静宁鸡为研究对象,利用 PCR 获得 PPAR α 基因序列,然后利用生物信息学手段对该基因的结构及功能进行分析和预测,以期为进一步研究静宁鸡脂质代谢中 PPAR α 的调控作用提供基础。

1 材料与方法

1.1 试验动物

6月龄静宁鸡购于静宁绿洲生态农业科技发展有限公司。

1.2 试剂

Reverse Transcriptase M-MLV (RNase H-) 等反转录相关试剂、TaKaRa *Ex Taq* 等 PCR 反应相关试剂、pMD18-T Vector 均购自宝生物工程(大连)有限公司,Trizol 购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司,氨苄青霉素购自北京索莱宝科技有限公司,Axyen 胶回收试剂盒购自 Axyen 公司,BL2 感受态细胞购于上海碧云天生物技术有限公司,质粒小量提取试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.3 方法

1.3.1 组织总 RNA 的提取和 cDNA 合成 利用 Trizol 法提取静宁鸡肾脏的总 RNA,以 ddH₂O 溶解总 RNA, -80℃ 保存备用;参考 RTase M-MLV (RNase H-) 反转录操作步骤合成 cDNA, -20℃ 保存备用。

1.3.2 引物的设计及 PPAR α 基因的克隆 根据 NCBI 公布的原鸡的 PPAR α 基因的 CDS 序列(NM_001001464),用 Primer 5.0 软件进行引物设计。所设计的引物序列为:PPAR α -F: 5'-AGTGACCGCTC-TACTTGACCAA-3'; PPAR α -R: 5'-CTCCGAAC-CGAGTGAACAGC-3',引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。

以合成的 cDNA 第一链为模板,进行 PCR 扩增。反应体系为: TaKaRa *Ex Taq* (5 U/ μ l) 0.5 μ l, 10 \times *Ex Taq* Buffer (mg²⁺ Plus) (20 mmol/L) 2.5 μ l, dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 2.0 μ l, 引物 PPAR α -F (10 μ mol/L) 0.5 μ l, 引物 PPAR α -R (10 μ mol/L) 0.5 μ l, cDNA 2.0 μ l, 添加灭菌水至 25.0 μ l。扩增反应程序为: 95℃ 预变性 5 min; 95℃ 变性 3 min, 62.3℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 80 s, 35 个循环,最后在 72℃ 条件下进行 10 min 的延伸, 4℃ 保存。扩增产物经过 1.2%

琼脂糖凝胶电泳检测后,切胶回收目的片段。与 pMD18-T Vector 载体 16 ℃ 恒温连接 0.5 h 后,利用热激法转 BL2 感受态细胞,挑出阳性克隆进行培养,然后提取质粒进行 PCR 验证,并将质粒送至宝生物工程(大连)有限公司进行测序。测序结果用 DNASTar、MegAlign 和 Editseq 软件比对和拼接获得静宁鸡 *PPARα* 基因 CDS 序列。

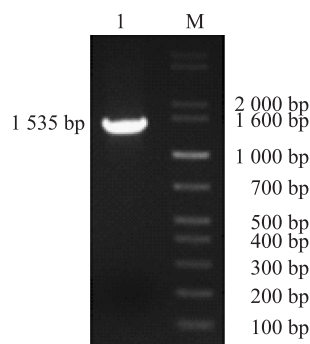
1.3.3 *PPARα* 基因的生物信息学分析 采用在线软件 ProtParam (<http://www.expasy.ch/tools/prot-param.html>) 预测 *PPARα* 蛋白的理化性质,采用 ProtScale (<http://www.expasy.ch/tools/prot-scale.html>) 预测 *PPARα* 蛋白的疏水性,采用 SignalP4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测 *PPARα* 蛋白的信号肽,采用 NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) 预测 *PPARα* 蛋白的 N-糖基化位点,采用 NetOGlyc 4.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) 预测 *PPARα* 蛋白的 O-糖基化位点,采用 NetPhos-3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/>) 预测 *PPARα* 蛋白的磷酸化位点,采用 TMPred (<http://ch.embnet.org/software/TMPRED-form.html>) 预测 *PPARα* 蛋白的跨膜结构,采用 PSORT II Prediction (<http://psort.hgc.jp/form.html>) 预测 *PPARα* 蛋白的亚细胞定位,采用 APSSP2 (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_gor4.html) 预测 *PPARα* 蛋白二级结构,采用 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 预测 *PPARα* 蛋白三级结构,采用 HMMER (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/search/jackhmmer>) 预测 *PPARα* 蛋白保守结构,采用 NCBI 中 BLAST 进行 *PPARα* 蛋白同源性分析,最后,通过 CLUSTALX 对 *PPARα* 氨基酸序列进行比对,然后采用 MEGA 5.10 软件基于 NJ (Neighbor-joining) 法构建 *PPARα* 蛋白的系统进化树,距离校正使用泊松模型,计算时将空位完全删除,自举分析通过 1 000 次循环实现。

2 结果与分析

2.1 静宁鸡 *PPARα* 基因的克隆

采用 TRIzol 法对静宁鸡肾脏的总 RNA 进行提取,并进行琼脂糖凝胶电泳检测。结果表明,总 RNA 条带清晰,无拖尾,整体质量较高,符合基因克

隆的要求。目的基因的 PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,结果显示,在 1 500 bp 左右有明亮的条带,如图 1 所示。分析测序结果表明 *PPARα* 基因 CDS 区的 24 bp 处是起始密码子 ATG,1 430 bp 处是终止密码子 TAA。该序列 BLAST 的结果显示目的片段与 NCBI 上登录的原鸡 *PPARα* 基因的 CDS 序列 (NM_001001464) 99% 相同,说明静宁鸡 *PPARα* 基因已被成功克隆出来。



M: 1 kb plus DNA ladder; 泳道 1: *PPARα* 基因 PCR 产物。

图 1 静宁鸡 *PPARα* 基因 PCR 扩增产物检测结果

Fig.1 Detection results of the *PPARα* gene amplification products in Jingning chicken by PCR

2.2 静宁鸡 *PPARα* 蛋白的生物信息学分析

2.2.1 *PPARα* 蛋白的氨基酸序列及理化性质分析

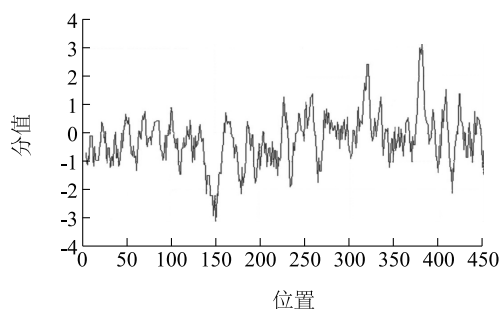
通过在线软件 ProtParam 分析 *PPARα* 蛋白的理化性质,结果表明,*PPARα* 的 CDS 区包含 1 407 个核苷酸,编码 468 个氨基酸,氨基酸组成见图 2,分子量为 52 300,理论等电点为 5.85,含强酸性氨基酸 (Asp+Glu) 61 个,强碱性氨基酸 (Arg+Lys) 52 个,*PPARα* 蛋白的分子式为 $C_{2301}H_{3661}N_{625}O_{698}S_{32}$,组成的原子总数为 7 317 个。预测该蛋白质不稳定系数为 44.20,表明该蛋白质为一个不稳定蛋白质。在哺乳动物细胞中的半衰期为 30 h,在酵母中的半衰期大于 20 h,在细菌中的半衰期大于 10 h。

2.2.2 静宁鸡 *PPARα* 蛋白的疏水性和跨膜结构域分析 利用在线软件 ProtScale 预测静宁鸡 *PPARα* 蛋白氨基酸序列的亲水性/疏水性,结果如图 3 所示,第 381 位赖氨酸 (Lys) 疏水性最强 (+3.156),第 150 位的丙氨酸 (Ala) 亲水性最强 (-3.078),Z 值为 -0.225,表明 *PPARα* 蛋白为亲水性蛋白质。使用 TMPred 跨膜结构预测服务器对 *PPARα* 蛋白的氨基酸序列进行预测,结果发现,*PPARα* 蛋白不存在跨膜区域,结果如图 4 所示。

```

1  ATGGTGGACACTGAAAACCAGCTCTATCCACTTACTCCCCTGGAGGAGGATGATATAGGTAGTCCTTTATCTGGA
1  M V D T E N Q L Y P L T P L E E D D I G S P L S G
76  GAGTTTCTACAAGATATGGAGAACATTCAAGACATTCTCAGTCTCTAGGTGATGATAGCTCTGGAGCTTTAAGT
26  E F L Q D M E N I Q D I S Q S L G D D S S G A L S
151  TTAACGGAGTTCCAATCGCTGGGAAATGGTCCAGGATCTGATGGATCAGTTATAACAGACACCCTTTCACCAGCA
51  L T E F Q S L G N G P G S D G S V I T D T L S P A
226  TCCAGTCTTCATCCATTAATTTTGCCACAGCTCCAGGTAGCATAGATGAATCACCCAGTGGAGCATTAAACATT
76  S S P S S I N F A T A P G S I D E S P S G A L N I
301  GAATGTAGAATTTGTGGGGATAAAGCCTCAGGCTACCATTACGGAGTACATGCTTGTGAAGGTTGTAAGGGTTT
101  E C R I C G D K A S G Y H Y G V H A C E G C K G F
376  TTTAGGAGAACCATCCGATTGAAACTCATCTATGATAAAATGCGATCGCAATTGCAAAATTCAGAAAAAAATCGT
126  F R R T I R L K L I Y D K C D R N C K I Q K K N R
451  AATAAGTGCCAATACTGTGCTTTTCAGAAGTGCCTTTCAGTTGGAATGTCACATAATGCAATACGTTTGGACGA
151  N K C Q Y C R F Q K C L S V G M S H N A I R F G R
526  ATGCCAAGGTCTGAGAAGGCCAAGTTGAAAGCAGAAATCTAACGGGTGAAAATTATGTAGAAGATTGAGAAATG
176  M P R S E K A K L K A E I L T G E N Y V E D S E M
601  GCAGATCTTAAACCACTTGCCAAAAGAATTCATGATGCTTACCTGAAAAACTTCAATATGAACAAGGTTAAAGCC
201  A D L K P L A K R I H D A Y L K N F N M N K V K A
676  AGAGTCATCCTTGCAGGGAATAACAACAATCCACCGTTTGTATACATGATATGGATACCTTGTGCATGGCA
226  R V I L A G K T N N N P P F V I H D M D T L C M A
751  GAGAAGACGCTGGTGGCAAAATGGTTGCCAATGGAATTCAGAATAAGGAAGCCGAAGTTGCAATCTTCCACTGC
251  E K T L V A K L V A N G I Q N K E A E V R I F H C
826  TGCCAGTGTACCTCTGTAGAGACTGTACAGAACTTACCGAATTTGCCAAATCTATCCCTGGCTTCTCCAATCTT
276  C Q C T S V E T V T E L T E F A K S I P G F S N L
901  GACTTGAATGATCAAGTGACACTGTTGAAATATGGAGTTTATGAAGCCATCTTTGCCATGTTAGCATCTGTAATG
301  D L N D Q V T L L K Y G V Y E A I F A M L A S V M
976  AACAAAGATGGGATGCTGGTAGCCTATGAAATGGTTTATAACCCGAGAGTTCCTGAAAAGTCTGAGAAAGCCA
326  N K D G M L V A Y G N G F I T R E F L K S L R K P
1051  TTCTGTGATATAATGGAGCCAAAATTTGATTTTGCAATGAAATTCATGCATGGAAGTGGATGATAGTGACATA
351  F C D I M E P K F D F A M K F N A L E L D D S D I
1126  TCACTTTTGTGCTGCTGCCATCATTTGCTGTGGAGATCGTCTGCTGTTGTAATGTAGGACACATGAAAAATG
376  S L F V A A I I C C G D R P G L V N V G H I E K M
1201  CAGGAGAGCATTGTGCATGTACTGAACTGCACCTTGCAAACCAACCATCCTGACGATATCTTCTCTCCCGAAA
401  Q E S I V H V L K L H L Q T N H P D D I F L F P K
1276  CTCTCCAAAAAATGGCTGACCTCCGGCAACTTGTCACAGAGCAGCTCAACTTGTTTCAGATAATCAAGAAGACT
426  L L Q K M A D L R Q L V T E H A Q L V Q I I K K T
1351  GAATCTGATGCACATTTACACCTTTACTGCAGGAAATTCACAGGGACATGTATTAA
451  E S D A H L H P L L Q E I Y R D M Y *

```

图2 静宁鸡 *PPAR α* 基因碱基序列及对应的氨基酸序列Fig.2 Base sequence and amino acid sequence of *PPAR α* gene in Jingning chicken图3 静宁鸡 *PPAR α* 蛋白疏水性分析Fig.3 The hydrophobicity analysis of *PPAR α* protein in Jingning chicken

2.2.3 静宁鸡 *PPAR α* 蛋白的信号肽和糖基化位点分析 采用在线软件 SignalP 4.1 Server 进行信号肽预测,结果显示,*PPAR α* 蛋白不包含信号肽。使用 NetNGlyc1.0 Server 和 NetOGlyc 4.0 Server 分别预测

PPAR α 蛋白 *N*-糖基化位点和 *O*-糖基化位点,结果发现 *PPAR α* 蛋白没有 *N*-糖基化位点,但是在 56、66、69、71、73、75、77、79、80、85、89、93、95、167、179、233 处发现了 *O*-糖基化位点。

2.2.4 静宁鸡 *PPAR α* 蛋白磷酸化位点分析 利用在线软件 NetPhos-3.1 Server 预测 *PPAR α* 蛋白磷酸化位点,结果显示,有 25 个丝氨酸(Ser)磷酸化位点,分别在 21、24、38、40、45、50、56、63、66、73、76、77、79、80、89、93、95、110、163、179、198、293、323、346 和 452 位;有 12 个苏氨酸(Thr)磷酸化位点,分别在 12、71、129、246、253、279、283、285、288、307、438 和 450 位;有 6 个酪氨酸(Tyr)磷酸化位点,分别在 9、194、214、314、464 和 468 位,结果如图 5 所示。

2.2.5 静宁鸡 *PPAR α* 蛋白的亚细胞定位预测 利用 PsortIIProtein Sorting Prediction 软件对静宁鸡

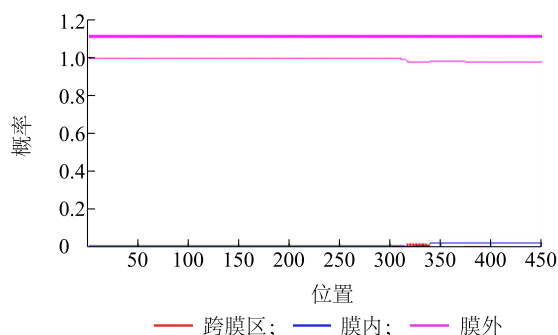


图4 静宁鸡 PPAR α 蛋白跨膜结构预测

Fig.4 The transmembrane structure prediction of PPAR α protein in Jingning chicken

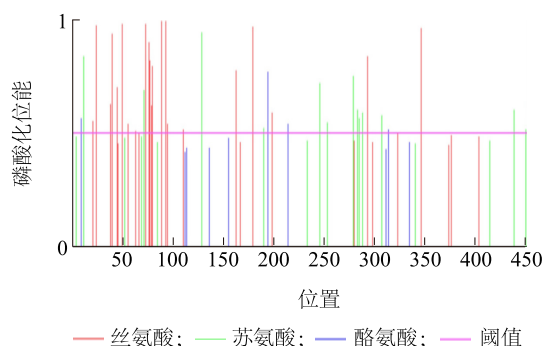


图5 静宁鸡 PPAR α 蛋白磷酸化位点预测

Fig.5 The phosphorylation sites prediction of PPAR α protein in Jingning chicken

PPAR α 蛋白进行亚细胞定位预测,结果显示,静宁鸡 PPAR α 蛋白主要定位于细胞质(47.8%),其他定位于细胞核(26.1%)、线粒体(17.4%)、内质网(4.3%)和高尔基体(4.3%)。由此预测静宁鸡 PPAR α 蛋白可能为胞质蛋白。

2.2.6 静宁鸡 PPAR α 蛋白保守结构域预测 利用在线软件 HMMER 预测,结果发现静宁鸡 PPAR α 蛋白在第 100~168 个氨基酸之间有 1 个核激素受体中的 C4 锌指结构(ZnF_C4 结构域),在第 264~449 个氨基酸之间有 1 个核激素受体配体结合结构域(HOLI 结构域)。

2.2.7 静宁鸡 PPAR α 蛋白二级结构预测 使用在线软件 NPSA 对静宁鸡 PPAR α 蛋白二级结构进行分析,结果如图 6 所示,176 个氨基酸参与 α -螺旋,占比为 37.61%;83 个氨基酸参与 β -折叠,占比为 17.74%;209 个氨基酸参与无规则卷曲,占比为 44.66%。由此说明,在静宁鸡 PPAR α 蛋白二级结

构中, α -螺旋和无规则卷曲是主要的结构形式。

2.2.8 静宁鸡 PPAR α 蛋白的三级结构预测 利用在线软件 SWISS-MODEL 的自动建模功能,对静宁鸡 PPAR α 蛋白三级结构进行预测,三维模型如图 7 所示。用于建立该模型的氨基酸残基范围为 101~419 位,该模型以 3e00.1.B (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma) 蛋白为模板,序列同源性为 64.39%。应用 NCBI 网站中 Conserved domain search 工具分析,证明 PPAR α 蛋白是过氧化物酶体增殖剂激活受体。

2.2.9 静宁鸡 PPAR α 多序列比对分析及系统进化树 对静宁鸡 PPAR α 核苷酸序列和其他从 NCBI 下载的 PPAR α 核苷酸序列进行多序列比对。经 BLAST 在线分析,与静宁鸡 PPAR α 核苷酸序列同源性高达 99% 的为原鸡 (Gallus gallus, NM001001464.1),同源性高达 98% 的分别为火鸡 (Meleagris gallopavo, XM_010716016.2) 和吐绶鸡 (Numida meleagris, XM_0213932 -56.1),同源性高达 97% 的为鹌鹑 (Coturnix japonica, XM_015870635.1),同源性高达 96% 的分别为绿头鸭 (Anas platyrhynchos, XM_021273687.1)、阿德利企鹅 (Pygoscelis adeliae, XM_009323646.1)、卷羽鹈鹕 (Pelecanus crispus, XM_009484690.1)、帝企鹅 (Aptenodytes forsteri, XM_009283535.2)、仓鸮 (Tyto alba, XM_009965270.1)、鸿雁 (Anser cygnoides, KJ010765.1)、灰雁 (Anser anser, AF481797.1)、白尾鹈鹕 (Phaethon lepturus, XM_010290610.1)、白鹭 (Egretta gaettarz, XM_009648790.1)、灰冠鹤 (Balearica regulorum gibbericeps, XM_010300944.1)、朱鹮 (Nipponia nippon, XM_009465045.1) 和加拿大金雕 (Aquila chrysaetos Canadensis, XM_011583046.1)。静宁鸡与原鸡相比,PPAR α 基因编码的氨基酸在 98 (亮氨酸/谷氨酸) 和 186 (脯氨酸/亮氨酸) 处发生突变,结果如图 8 所示。利用 MEGA 6.10 软件构建 NJ 进化树,如图 9 所示。分析结果表明静宁鸡与原鸡,火鸡,吐绶鸡和鹌鹑的 PPAR α 基因亲缘关系较近,其中与原鸡的亲缘关系最近。

3 讨论

PPAR α 是脂肪酸氧化酶基因的主要转录调控子,在调节脂质代谢平衡中起主要作用^[11]。在本研究中,基于 NCBI 公布的原鸡的 PPAR α 基因的 CDS



h: α -螺旋; e: β -折叠; c: 无规则卷曲。

图 6 静宁鸡 PPAR α 蛋白二级结构预测

Fig.6 Predicted secondary structure of PPAR α protein in Jingning chicken

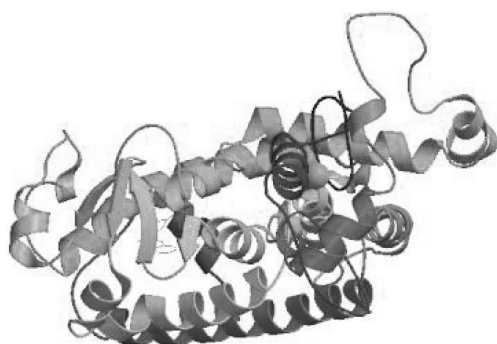


图7 静宁鸡 PPAR α 蛋白三级结构预测

Fig.7 Predicted tertiary structure of PPAR α protein in Jingning chicken

序列,通过 Primer 5.0 软件设计特异性引物,从静宁鸡肾脏中成功克隆了该基因的全长 CDS 序列。该 CDS 序列全长 1 407 bp,所编码的蛋白质包含 468 个氨基酸。其分子量为 52 300,理论等电点为 5.85,分子式为 $C_{2\,301}H_{3\,661}N_{625}O_{698}S_{32}$,组成的原子总数为 7 317 个。马云等研究发现鸭 *PPARα* 基因的 cDNA 全长 1 430 bp,最长开放阅读框为 1 407 bp,共编码 468 个氨基酸^[12]。孟和等研究发现鹅 *PPARα* 基因的 cDNA 序列长度为 1 407 bp^[13]。林森等从藏鸡肝脏组织中成功克隆得到 *PPARα* 基因,该基因编码区大小为 1 404 bp,编码 468 个氨基酸^[14]。因此本研

究结果与查阅的文献结果一致,说明已经成功克隆出静宁鸡 *PPAR α* 基因。

磷酸化是蛋白质最常见和最重要的一种蛋白翻译后的修饰^[15],并在许多生物反应中通过磷酸基团的变化,即添加或去除,发挥着“开关”作用^[16]。糖基化具有调节蛋白质功能的作用,例如改善凝胶性和水合性等^[17]。本研究中,静宁鸡 PPAR α 蛋白为亲水性蛋白质,且不存在跨膜区域,不包含信号肽,没有 *N*-糖基化位点,但存在 16 个 *O*-糖基化位点,存在 25 个丝氨酸 (Ser) 磷酸化位点、12 个苏氨酸 (Thr) 磷酸化位点和 6 个酪氨酸 (Tyr) 磷酸化位点,静宁鸡 PPAR α 蛋白主要位于细胞质中。据报道,PPAR α 通过锌指结构域与视黄酸受体形成异源二聚体,然后与配体结合区 (HOLI) 连接。配体激活后的异源二聚体与靶基因启动子上的 PPAR α 反应元件结合以激活靶基因活化,调节转录表达,然后调节脂类的氧化^[18-19]。本研究中,利用在线分析软件预测结果显示静宁鸡 PPAR α 蛋白在第 100~168 个氨基酸之间有 1 个 ZnF_C4 结构域,在第 264~449 个氨基酸之间有 1 个 HOLI 结构域,与查阅的文献结果^[14]一致。

在静宁鸡 PPAR α 蛋白的二级和三级结构中, α -螺旋和无规则卷曲是主要的结构形式, β -折叠占比相对较少。多序列比对分析及系统进化树结果表

Query	1	MVDTENQLYPLTPLEEDDIGSPLSGEFLQDMENIQDISQSLGDDSSGALSLTEFQSLGNG	60
Sbjct	1	MVDTENQLYPLTPLEEDDIGSPLSGEFLQDMENIQDISQSLGDDSSGALSLTEFQSLGNG	60
Query	61	PGSDGSVITDTLSPASSPSSINFATAPGSIDESPSGALNIECRICGDKASGYHYGVHACE	120
Sbjct	61	PGSDGSVITDTLSPASSPSSINFATAPGSIDESPSGA NIECRICGDKASGYHYGVHACE	120
Query	121	GCKGFFRRTIRLKLKYDKCDRNCKIQKKNRNKCQYCRFQKCLSVGMSHNAIRFGRMPRSE	180
Sbjct	121	GCKGFFRRTIRLKLKYDKCDRNCKIQKKNRNKCQYCRFQKCLSVGMSHNAIRFGRMPRSE	180
Query	181	KAKLKAELTGENYVEDSEMADLKPLAKRIHDAYLKNFNMNKVKARVILAGKTNNNPPFV	240
Sbjct	181	KAKLKAELTGENYVEDSEMADLK LAKRIHDAYLKNFNMNKVKARVILAGKTNNNPPFV	240
Query	241	IHDMDTLCMAEKTIVAKLVANGIQNKEAEVRIFHCCQCTSVETVTELEFAKSIPGFSNL	300
Sbjct	241	IHDMDTLCMAEKTIVAKLVANGIQNKEAEVRIFHCCQCTSVETVTELEFAKSIPGFSNL	300
Query	301	DLNDQVTLKYGVEAIFAMLASVMNKDGMVLVAYGNGFITREFLKSRLKPFCDIMEPKFD	360
Sbjct	301	DLNDQVTLKYGVEAIFAMLASVMNKDGMVLVAYGNGFITREFLKSRLKPFCDIMEPKFD	360
Query	361	FAMKFNALELDDSDISLFVAAIICCGDRPGLVNVGHIEKMQESIVHVLKLHLQTNHPDDI	420
Sbjct	361	FAMKFNALELDDSDISLFVAAIICCGDRPGLVNVGHIEKMQESIVHVLKLHLQTNHPDDI	420
Query	421	FLFPKLLQKMADLRQLVTEHAQLVQIIKKTESDAHLHPLLQEIYRDMY	468
Sbjct	421	FLFPKLLQKMADLRQLVTEHAQLVQIIKKTESDAHLHPLLQEIYRDMY	468

图 8 静宁鸡与原鸡 PPARα 蛋白氨基酸序列对比
Fig.8 Comparisons of amino acid sequences of PPARα protein between Jingning chicken and Gullus gallus

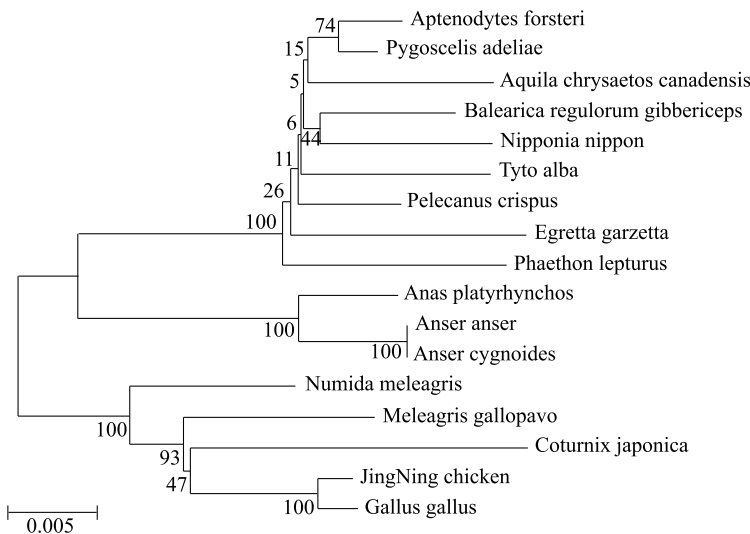


图 9 静宁鸡 PPARα 基因编码的蛋白质氨基酸序列系统进化树
Fig.9 The phylogenetic tree of amino acid sequence of the protein encoded by PPARα gene in Jingning chicken

明,静宁鸡 *PPARα* 基因与原鸡,火鸡,吐绶鸡和鹌鹑的 *PPARα* 基因亲缘关系较近,其中与原鸡的亲缘关系最近。

家禽 *PPARα* 基因调节脂肪代谢,影响家禽脂肪的沉积,从而影响腹脂率和胴体品质^[2]。因此,静宁鸡 *PPARα* 基因的成功克隆和功能预测为进一步

研究 *PPARα* 基因在静宁鸡脂代谢中的作用和揭示 *PPARα* 基因功能提供了基础,为低脂高质量鸡育种提供基础研究资料。

参考文献:

[1] ISSEMANN L, GREEN S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by perxisome proliferators[J]. Na-

- ture, 1990, 347(6294):645-650.
- [2] 黄春红, 肖调义, 刘巧林, 等. 畜产动物过氧化物酶体增殖物激活受体基因的表达模式及功能研究进展[J]. 动物营养学报, 2013, 25(5):923-931.
- [3] BRAISSANT O, FOUFELLE F, SCOTTO C, et al. Differential expression of peroxisome proliferator activated receptors (PPARs): Tissue distribution of PPAR- α , - β , and - γ in the adult rat[J]. Endocrinol, 1996, 137:345-349.
- [4] ELBRECHT A, CHEN Y, CULLINAN C A, et al. Molecular cloning, expression and characterization of human peroxisome proliferator activated receptors γ 1 and γ 2[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1996, 224:431-437.
- [5] SUNDVOLD H, GRINDFLEK E, LIEN S. Tissue distribution of porcine peroxisome proliferator-activated receptor α : detection of an alternatively spliced mRNA[J]. Gene, 2001, 273:105-113.
- [6] DIOT C, DUAIRE M. Characterization of a cDNA sequence encoding the peroxisome proliferator-activated receptor α in the chicken[J]. Poultry Science, 1999, 78:119-1202.
- [7] 孟和, 李辉, 王宇祥. 鸡 *PPARs* 基因组织表达特性的研究[J]. 遗传学报, 2004, 31(7): 682-687.
- [8] 田亚东, 亢娟娟, 孙桂荣, 等. *PPAR α* 基因对安卡 \times 固始鸡资源群胴体品质的遗传效应分析[J]. 华北农学报, 2010, 25(6): 14-18.
- [9] 孟和, 王桂华, 王启贵, 等. 鸡 *PPAR α* 基因单核苷酸多态与脂肪性状相关的研究[J]. 遗传学报, 2002, 29(2):119-123.
- [10] 李宏强. 静原鸡的地方品种形成及其种质资源保护措施[J]. 中国家禽, 2009, 31(3):52.
- [11] 张玥, 姜宁, 苏丽, 等. *PPAR α* 与运动改善脂质代谢的关系[J]. 中国康复医学杂志, 2008, 23(6):495-504.
- [12] 马云, 王云云, 张晓婷, 等. 鸭 *PPAR α* 基因结构及功能的生物信息学分析[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2011, 37(4):371-379.
- [13] 孟和, 李辉, 王宇祥. 鹅 *PPAR α* 基因全长 cDNA 的克隆和序列分析[J]. 遗传, 2004, 26(4):469-472.
- [14] 林森, 徐亚欧, 林亚秋, 等. 藏鸡 *PPAR α* 基因克隆与生物信息学分析[J]. 西南民族大学学报(自然科学版), 2015, 41(6):661-666.
- [15] KIM J H, LEE J, OH B, et al. Prediction of phosphorylation sites using SVMs[J]. Bioinformatics, 2004, 20(17):3179-3184.
- [16] EMANUELSSON O, NIELSEN H, BRUNAK S, et al. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence[J]. Journal of Molecular Biology, 2000, 300(4): 1005-1016.
- [17] MARCHAL I, GOLFIER G, DUGAS O, et al. Bioinformatics in glycobiology[J]. Biochimie, 2003, 85(1/2):75-81.
- [18] NEVE B P, FRUCHART J C, STAELS B. Role of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) in atherosclerosis[J]. Biochemical Pharmacology, 2000, 60(8):1245-1250.
- [19] LALLOYER F, STAELS B. Fibrates, glitazones and peroxisome proliferator-activated receptors[J]. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, 2010, 30(5):894-899.

(责任编辑:陈海霞)